

**WEST****End of Result Set**

Generate Collection

Print

L7: Entry 1 of 1

File: DWPI

Mar 29, 2000

DERWENT-ACC-NO: 2000-431995  
DERWENT-WEEK: 200038  
COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New fusion protein for immunotherapy of venereal disease and cancer - is a heat shock protein of Mycobacterium bovis

INVENTOR: ZHOU, G

PRIORITY-DATA: 1998CN-0112264 (September 24, 1998)

## PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
CN 1248631 A	March 29, 2000		000	C12P021/00

INT-CL (IPC): C07 K 19/00; C12 P 21/00

ABSTRACTED-PUB-NO: CN 1248631A  
BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - A heat shock protein of mycobacterium bovis var. BCG (M. Bovis BCG) which is fused with a tumor specific antigen, especially human papillomavirus (HPV) to form a fusion protein, is new.

DETAILED DESCRIPTION - The fusion protein can be expressed in colibacillus, microzyme and plants.

USE - The fusion protein is used to make immunostimulant injections, as it can produce specific cell immune and humoral immune responses. It possesses prophylaxis and therapeutic capacity for preventing human papillomavirus (HPV) infection, but also can be used for immunotherapy of pointed condyloma, tumor and cancer caused by HPV.

ABSTRACTED-PUB-NO: CN 1248631A  
EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12P 21/00

C07K 19/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98112264.7

[43]公开日 2000年3月29日

[11]公开号 CN 1248631A

[22]申请日 1998.9.24 [21]申请号 98112264.7

[71]申请人 周国庆

地址 643100 四川省荣县四川裕丰机械厂周树成

[72]发明人 周国庆

权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 一种免疫预防和免疫治疗性病和癌症的融合蛋白

[57]摘要

本发明融合细菌 mycobacterium bovis var. BCG (M. Bovis BCG) 的热休克蛋白到 肿瘤特异性的抗原即人类乳头瘤病毒(HPV)上而构成融合蛋白。这种融合蛋白表达在大肠杆菌、酵母菌和植物中。用这种融合蛋白进行免疫注射,产生 对肿瘤特异性抗原的特异性细胞免疫和体液免疫反应,不仅具有免疫预防人类 乳头瘤病毒(HPV)侵染的能力,而且,免疫预防和免疫治疗由 HPV 引起的尖锐湿疣、肿瘤和癌症,因此,该种类型的重组融合蛋白,提供了一种简单 有效的预防免疫制剂和治疗免疫制剂。

ISSN 1000-8427

专利文献出版社出版

1. 本发明是一种治疗性病和由性病引起的癌症的融合蛋白。权利要求重组融合蛋白的方法，即融合 *mycobacterium bovis* var. BCG 的热休克蛋白(Heat shock protein)到人类乳头瘤病毒(HPV)的病毒蛋白上。
2. 如权利要求 1 所述的方法，热休克蛋白的一部份或全部融合于人类乳头瘤病毒的病毒蛋白的一部份或全部上，构成融合蛋白。
3. 如权利要求 1、2 所述的方法，重组融合蛋白 N-末端的氨基酸来自于 *mycobacterium bovis* var. BCG 的热休克蛋白，C-末端氨基酸来自于人类乳头瘤病毒 (HPV) 类型 16(HPV-16)或类型 18(HPV-18)的早期表达的蛋白(如 HPV-16 的 E4 或 E5 或 E6 或 E7)。
4. 如权利要求 1、2 所述的方法，重组融合蛋白 N-末端的氨基酸来自于人类乳头瘤病毒 (HPV) 类型 16(HPV-16)或类型 18(HPV-18)的早期表达的蛋白(如 HPV-16 的 E4 或 E5 或 E6 或 E7)，C-末端氨基酸来自于 *mycobacterium bovis* var. BCG 的热休克蛋白。
5. 如权利要求 1、2、3 和 4 所述的融合蛋白，重组融合蛋白的 N-末端可接多个组氨酸(Histidine)的领头顺序(Histidine-tagged)，便于纯化。
6. 如权利要求 1、2、3、4、5 所述的重组融合蛋白，可通过质粒载体表达在大肠杆菌、酵母菌和植物中。
7. 如权利要求 1、2、3 和 5 所述的重组融合蛋白，其 N-末端的氨基酸来自于 *mycobacterium bovis* var. BCG 的 65kDa 或 70kDa 热休克蛋白，C-末端氨基酸来自于人类乳头瘤病毒 (HPV) 类型 16(HPV-16)或类型 18(HPV-18)的早期表达的蛋白(如 HPV-16 的 E4 或 E5 或 E6 或 E7)。
8. 如权利要求 7 所述的重组融合蛋白 Hsp-E7，其 N-末端 539 个的氨基酸来自于 *mycobacterium bovis* var. BCG 的 65kDa 热休克蛋白，C-末端 98 个氨基酸来自于人类乳头瘤病毒 (HPV) 类型 16(HPV-16)的早期表达的蛋白 E7。
9. 如权利要求 8 所述的重组融合蛋白 Hsp-E7，其氨基酸顺序如说明书附图 1。
10. 如权利要求 8、9 所述的重组融合蛋白 Hsp-E7，其 N-末端可接多个组氨酸 (Histidine) 的领头顺序，便于纯化。
11. 如权利要求 8、9、10 所述的重组融合蛋白 Hsp-E7 和 N-末端可带多个组氨酸(Histidine)的重组融合蛋白(h)Hsp-E7，不仅具有免疫预防人类乳头瘤病毒 (HPV) 侵染的能力，而且具有免疫预防和免疫治疗由人类乳头瘤病毒(HPV)引起的尖锐湿疣、肿瘤和癌症的作用。

## 实施方案

### (1)重组融合蛋白的结构

融合热休克蛋白(Hsp)到肿瘤特异性的抗原(HPV)上而构成融合蛋白。以重组融合蛋白 Hsp-E7 为例,其 N-末端的 539 个氨基酸来自于 *mycobacterium bovis var. BCG* 的 65kda(千道尔顿)的热休克蛋白; C-末端 98 个氨基酸来自于人类乳头瘤病(HPV)类型 16 的早期蛋白 E7,其蛋白质的氨基酸顺序如图 1,预计的分子量约 67737 道尔顿。

HspE7 的 N-末端可接多个组氨酸(Histidine)的领头顺序,便于纯化。

### (2)重组融合蛋白 HspE7 在大肠杆菌中的表达。

重组融合蛋白克隆在 pet28a 载体上,其启动子为 T7,可被 IPTG 诱导表达该重组蛋白。重组融合蛋白也可克隆在其它大肠杆菌的载体上,表达在大肠杆菌中。

### (3)重组融合蛋白表达于植物中

重组融合蛋白可克隆于 pBI121 或 pBI221 上,分别通过农杆菌和基因枪转入植物中,在植物中表达。重组融合蛋白也可克隆在其它质粒载体上,表达在植物中。

### (4)重组融合蛋白可克隆于酵母的质粒载体上,在酵母中表达。

## 实施例

(1)重组融合蛋白 Hsp-E7 克隆在 pet28a 载体上,其启动子为 T7,在大肠杆菌中表达。

(2)重组融合蛋白可克隆于 pBI121 或 pBI221 上,在植物中表达。其启动子为 2x CaMV35S+AMV RNA4 启动子和增强子。

(3)重组融合蛋白可克隆于酵母的质粒载体上,在酵母中表达。

(4)用重组融合蛋白 Hsp-E7 免疫老鼠,不仅诱导细胞免疫而且也诱导体液免疫。这些免疫对 HPV-16-E7 是特异性的。进一步,用这种在生理盐水中的重组融合蛋白进行预防免疫,保护免受 HPV 和肿瘤的侵染挑战;而治疗性的免疫导致已存在的肿瘤消失。尽管大多数的资料是用一个具多个组氨酸的领头顺序的(Histidine-tagged)重组融合蛋白(h)Hsp-E7 得到的,但直接比较重组融合蛋白(h)Hsp-E7 与重组但没有组氨酸领头顺序(Histidine-tag)的融合蛋白 Hsp-E7,二者都具有同等预防 HPV 侵染、消除尖锐湿疣和肿瘤的能力。

## 说明书附图

图 1.

1 AKTIAYDEEARRGLERGLNALADAVKVTLG 30  
 31 PKGRNVVLEKKWGAPTITNDGVSIKEIEL 60  
 61 EDPYEKIGAEVLVEVAKTDDVAGDGTFTA 90  
 91 TVLAQALVREGLRNVAAGANPLGLKRGIEK 120  
 121 AVEKVTETLLKGAKEVETKEQIAATAAISA 150  
 151 GDQSIGDLIAEAMDKVGNVITVEESNTF 180  
 181 GLQLELTEGMRFDKGYISGYFVTDPERQEA 210  
 211 VLEDPYILLVSSKVSTVKCLLPLEKVIGA 240  
 241 GKPLLIIEADVEGEALSTLVVNKIRGTFKS 270  
 271 VAVKAPGFGDRRKAMLQDMAITGGQVISE 300  
 301 EVGLTLENADLSLLGKARKVVVTKDETTIV 330  
 331 EGAGDTDAIAGRVAQIRQEIENSDDSYDRE 360  
 361 KLQERLAKLAGGVAVIKAGAATEVELKERK 390  
 391 HRIEDAVRNAKAAVEEGIVAGGGVTLQAA 420  
 421 PTLDELKLEGDEATGANIVKVALEAPLKQI 450  
 451 AFNSGLEPGVVAEKVRNLPAGHGLNAQTGV 480  
 481 YEDLLAAGVADPVKVTRSALQNAASIAGLF 510  
 511 LTTEAVVADKPEKEKASVPGGGDMGGMDFH 540  
 541 MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLND 570  
 571 SSEEDEIDGPAGQAE PDRAHYNIVTFCK 600  
 601 CDSTLRCLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIV 630  
 631 CPICSQKP 638